透皮制剂专栏

用于经皮给药系统研究的皮肤模型与关键质量控制

朱慧勇，武余波，卢望丁，杨晓钰，胡阳阳，罗华菲*
（中国医药工业研究总院药物制剂国家工程研究中心，上海 201203）

摘要：皮肤模型是经皮给药系统产品开发中必须涉及的材料，皮肤模型的屏障性能是研究药物经皮渗透的关键要素之一。氚水（^3H_2O）体外经皮渗透和经皮水分蒸发（TEWL）是评价皮肤屏障功能的有效方法和重要指标。本研究表明，将皮肤的新鲜度、厚度、质量、TEWL 达到稳态等因素作为皮肤模型的质量控制手段，可进一步增加研究结果的可靠性和准确度。另外，本研究还通过对 7 种原研制剂中 8 个模型药物的体外经皮渗透性研究，获得了常用动物皮肤模型（裸鼠、小型猪）中药物经皮渗透吸收速率与临床释药速率之间的比例关系。本研究为经皮给药系统研究的皮肤模型选择提供了科学依据，表明经过规范有效质控的离体猪皮是理想的体外试验皮肤模型。

关键词：经皮给药；动物皮肤模型；体外经皮渗透；经皮水分蒸发；质量控制
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)05-0592-09
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.05.001

Skin Models and Critical Quality Control for the Studies of Transdermal Drug Delivery Systems

ZHU Huiyong, WU Yubo, LU Wangding, YANG Xiaoyu, HU Yangyang, LUO Huafei*
(*National Pharmaceutical Engineering Research Center, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: Animal skins, one kind of necessary study materials, play an important role in the development of transdermal products. The barrier characteristics of skins should be considered. The ^3H_2O *in vitro* transdermal permeability and transepidermal water loss (TEWL) are effective methods and important indicators for evaluating the barrier function of skins. The results showed that the freshness, thickness, mass and steady-state TEWL were the critical quality control points of the skin model, which could further improve the reliability and accuracy of the research results. In addition, the *in vitro* transdermal permeability tests of total eight model drugs from seven brand-name drugs were carried out to evaluate the correlation of the permeability rate in common animal skin models (nude mouse and mini pig skins) and the drug release rate in clinical practice. This study provided a scientific basis in selecting skin model and its results indicated that pig skin, under strict quality control, was preferred to be used in predicting the pharmacokinetics profiles of transdermal products.

Key Words: transdermal drug delivery; animal skin model; *in vitro* transdermal permeability; transepidermal water loss; quality control

皮肤是经皮传递系统中药物必须跨越的生理屏障，研究药物在皮肤中的转运吸收行为，是进行经皮给药系统处方设计、制剂评价以及产品临床安全性和有效性预测的重要步骤[1]。人体皮肤是最具临床价值的研究药物皮肤通透性的模型[2]，但来源较

收稿日期：2021-12-29
作者简介：朱慧勇(1993—)，男，助理研究员，从事经皮药物递送研究。
通信作者：罗华菲(1977—)，女，博士，研究员，博士生导师，从事经皮药物递送与新型黏附技术研究。
E-mail：luohuafei01@sinopharm.com

稀少，且存在通透性的个体差异。近年来，人工合成膜作为体外皮肤模型也有所应用，如硅橡胶、乙烯 - 乙酸乙烯共聚物、聚脲及其他稠环聚合物的水凝胶、微孔薄膜等。该类合成膜具有批间均匀度高、稳定性好、使用方便的优点，但其通透性屏障原理、物理化学性质等与人体皮肤存在较大差异，故用作临床预测的意义不大[3—4]。动物皮肤模型目前最为常用，研究及应用较多的动物模型涉及小鼠、大鼠、家兔、猴、猪等[2,5]。

小鼠皮肤的角质层薄，通透性远大于人皮，但因来源丰富、处理方便且结构与人皮相似，常用于药物透皮吸收研究，尤其多在早期处方筛选中应用[6—7]。大鼠皮肤也是经皮给药制剂药动学研究中应用较广泛的模型，同样具有使用方便、价格较便宜、与人皮较为相近等优势[8—9]。家兔皮肤也被用于透皮制剂的药动学评价[10]，但其厚度约为人皮的一半，许多研究表明实验动物中家兔的皮肤渗透性最大，难以作为经皮吸收预测模型。不过，由于家兔皮肤对药物吸收快的性质，常被用来考察药物的皮肤毒性[11—12]。灵长类动物如恒河猴的皮肤虽然与人皮接近，具有较高利用价值，但此类动物饲养、实验成本较高，一般的实验室条件难以满足要求，限制了其应用。

猪由于在解剖学、生理学、代谢等方面与人类相似，被广泛应用于生物医学领域。大量文献表明[13]，猪皮肤的组成、渗透性及体内代谢与人体较为相似。用于经皮研究的品种有 Gottingen 小型猪、Yucatan 小型猪（墨西哥无毛猪）、Yorkshire 猪、Landrace 猪及巴马香猪等。如 XING 等用被阉割的雄性 Yucatan 小型猪作为性腺功能减退的动物模型，考察了睾酮透皮贴剂（Androderm，美国 Waston 制药有限公司）的药代动力学，并与文献报道的人体临床数据进行比较[14]。虽然睾酮在小型猪体内的消除速率是在人体的 2.8 倍，导致峰浓度 c_{max} 和平均浓度 c_{avg} 较低，但经阉割处理的小型猪用药后，体内睾酮的药 - 时曲线表现出与人体用药后相似的趋势，说明透皮吸收机制相似，阉割小型猪可作为睾酮人体药动学研究合适的动物模型。PATEL 等在开发琥珀酸舒马普坦的离子电渗透皮给药系统时，用雌性 Yorkshire 猪进行体内药动学研究[15]。数据表明，舒马普坦通过离子电渗透皮给药的方案具有可行性，且血药浓度水平与口服、鼻腔或直肠给药途径相当。ZURDO SCHROEDER 等用热分离的人体表皮模型筛选了炔雌醇的成膜聚合溶液处方后，以上市避孕贴 EVRA® 做参比，用雌性 Landrace 猪评价了优选处方的渗透性[16]。

水是皮肤中的生理物质之一，正常皮肤中水的渗透速度恒定。不同种属动物皮肤由于解剖结构与人体皮肤具有差异，皮肤屏障系数不同，水分的经皮通透性也不同[17]。对皮肤的屏障功能进行评估和研究，在生理学、药理学及药剂学中均有重要意义。本研究采用液体闪烁法测定氚水（^3H_2O）经皮渗透量的变化[18]，研究离体皮肤屏障功能的改变，可更好地指导和建立科学合理的体外透皮试验方法。同时，对不同模型药物的体外经皮渗透性进行研究，获得常用动物皮肤模型（裸鼠、小型猪）中药物经皮渗透吸收速率与临床释药速率之间的比例关系，期望有助于前期处方筛选以及指导评价处方设计的合理性。由于皮肤的差异较大，不同部位的皮肤以及皮肤的新鲜度、厚度和水分均会影响皮肤的渗透性。通过控制影响皮肤渗透性的关键属性，可以实现皮肤源头的质量控制。

1 仪器与试药

TK-6A 和 TK-20A 型透皮扩散试验仪（上海锴凯科技贸易有限公司）；SN-6930 型液体闪烁计数器（上海原子核研究所日环光电仪器有限公司）；VapoMeter 经皮水分流失测量仪（芬兰 Delfin 公司）；LC20A 型高效液相色谱仪（包括 LC-20AD 型泵、SPD-20A 型紫外 - 可见检测器和 SIL-20AC 型自动进样器，日本岛津公司）。

Evra® 贴剂（美国 Janssen-Cilag 公司，规格为每贴 20 cm^2，含炔雌醇 0.6 mg 和诺孕曲明 6 mg）；Testopatch® 贴剂（法国 Pierre Fabre Médicament Production 公司，规格为每贴 60 cm^2，含睾酮 30 mg）；Sancuso® 贴剂（英国 ProStrakan Group 公司，规格为每贴 52 cm^2，含格拉司琼 34.3 mg）；Amiaid® 贴剂（日东电工株式会社，规格为每贴 10 cm^2，含妥洛特罗 2 mg）；Oxytrol® 贴剂（美国 Watson Laboratories

公司，规格为每贴 39 cm^2，含奥昔布宁 36 mg）；Vivelle-Dot® 贴剂（瑞士 Novartis Pharmaceuticals 公司，规格为每贴 10 cm^2，含雌二醇 1.56 mg）；Transtec®（Napp Pharmaceuticals 公司，制剂规格为每贴 25 cm^2，含丁丙诺啡 20 mg）；炔雌醇对照品（华润紫竹药业有限公司，含量 100.9%，批号 20050301）；诺孕曲明对照品（上海医药工业研究院，含量 98.3%，批号 20050201）；睾酮对照品（秦皇岛紫竹药业有限公司，供含量测定用，批号 H11050）；雌二醇对照品（含量 96.4%，批号 100182-200103）、盐酸格拉司琼对照品（含量 99.8%，批号 100558-200602）和盐酸妥洛特罗对照品（供含量测定用，批号 100472-200401）（中国食品药品检定研究院）；盐酸奥昔布宁对照品（USP Reference Standard，批号 10G281）；丁丙诺啡对照品（山西瑞福莱药业有限公司，含量 99.1%，批号 171244-200503）；^3H_2O 对照品（美国 PerkinElmer 公司，活度浓度 37 MBq/g，批号 3589067）；1,4-双 -（5- 苯基噁唑基 -2 苯）（POPOP，上海试剂一厂）；2,5-二苯基噁唑（PPO）、叠氮化钠、聚乙二醇（PEG）200、PEG 400、无水乙醇、乙酸乙酯（国药集团化学试剂有限公司）；甲醇、乙腈（色谱纯，默克公司）；纯净水（杭州娃哈哈有限公司）。

裸鼠［上海斯莱克实验动物有限公司，动物合格证号：SCXK（沪）2007-0005］；小型猪［上海南汇老港镇养殖场，动物许可证号：SCXK（沪）2007-0013］。

2　方法与结果

2.1　离体皮肤处理

动物（裸鼠或小型猪）处死后取背部完整皮肤，去除皮下脂肪层，用生理盐水洗净，于 －20 ～ －30 ℃保存。临用前于室温放置 15 min，用蒸馏水擦洗去除皮肤表面残留物，并用无纺布吸干皮肤表面水分，裁剪为适当大小，使用前应仔细检查皮肤的完整性和均匀性。

2.2　体外透皮试验（*in vitro* permeation testing，IVPT）

2.2.1　IVPT 的试验方法与条件

使用 TK-20A 型垂直透皮扩散试验仪考察不同原研贴剂的体外透皮性能。将皮肤角质层向上固定在装有磁力搅拌子的 Franz 扩散池接收池上，贴剂揭去防黏层后贴于皮肤角质层并排除贴剂与皮肤间的空气，盖上上半池并用铁夹夹紧。接收池中加入已预热且超声脱气的接收介质 7 ml（各药物相应的介质品种见表 1）。试验时有效扩散透皮面积为 3.14 cm^2，搅拌速度 250 r/min，接收介质温度控制在（32±0.2）℃。分别于试验开始后的一定时间取出接收液 0.3 ml（立即补充相应的同温等量新鲜接收介质），离心（13 523×g）5 min 后取上清液进行药物浓度检测。

2.2.2　药物分析检测方法及方法学验证结果

用 HPLC 法进行药物浓度测定（色谱条件见表 1，经专属性、线性、溶液稳定性、精密度、重复性、耐用性、准确度、检测限等试验验证，各方法准确可行），用以计算单位面积累积透过量 Q（cumulative amount permeated，CAP），绘制 Q-t 曲线，曲线稳态处切线的斜率即为药物的稳态透皮速率 J_{ss}，透皮时滞 t_{lag} 为曲线与 X 轴的交点。

2.3　皮肤屏障功能评价方法——^3H_2O 体外经皮渗透量的测定

采用 TK-6A 型透皮扩散池，以 ^3H_2O 经皮渗透量的变化评价皮肤屏障功能。

2.3.1　闪烁液配制

闪烁液由溶剂和闪烁剂组成，通常射线能量绝大部分先被溶剂吸收并在溶剂分子间传递，然后才传递给闪烁剂，因此要求溶剂的能量传递效率高、透明度好、溶解度大。闪烁剂分为第一闪烁剂和第二闪烁剂，常用作第一闪烁剂的有 PPO、2- 苯基 -5-（4'- 联苯基）-1,3,4- 噁二唑（PBD）、对三联苯（TP）等；常用作第二闪烁剂的有 POPOP、1,4- 双［2-（2- 甲基苯基）乙烯基］苯（bis-MSB）等[19]。此外，为提高探测效率及提高闪烁液对化学猝灭的耐受性，有时也会在闪烁液中加入一定浓度的萘。

由于样品溶液是水相，故本试验中选择与水相容性较好的二噁烷作为溶剂；选择 PPO、POPOP 分别作为第一闪烁剂和第二闪烁剂；萘的加入可以显著提高系统的计数率，且计数率随萘浓度的增加而增大，当萘浓度增至 100 g/L 时趋于稳定。最后确定闪烁液配制方法：二噁烷作为溶剂，其中各组分浓度分别为：PPO 7 g/L，POPOP 0.3 g/L，萘 100 g/L。

表 1 原研制剂 IVPT 试验中的接收介质和主成分检测方法

Tab.1 Receiving Media and Determination Methods for Main Ingredients of Brand-name Drugs in IVPT Studies

原研制剂	主药	分类	相对分子质量	接收介质	HPLC色谱条件[1)]		
					色谱柱	流动相	检测波长/nm
Amiaid®（tulobuterol patch）	妥洛特罗	离子型	227.79	pH 6.8磷酸盐缓冲液（PBS）	C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）	乙腈：水：磷酸：三乙胺（18：81.6：0.2：0.2）	208
Testopatch®（testosterone patch）	睾酮	内源性雄激素	288.42	40% PEG 400溶液	C_{18}柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）	甲醇：水（66：34）	241
Oxytrol®（oxybutynin patch）	奥昔布宁	离子型	357.45	pH 5.8 PBS	C_{18}柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）	甲醇：pH 6.8 PBS（85：15）	220
Sancuso®（granisetron patch）	格拉司琼	离子型	312.38	pH 5.5 PBS	C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）	甲醇：水（含0.1%三氟乙酸）（40：60）	302
Vivelle-Dot®（estradiol patch）	雌二醇	内源性雌激素	272.38	40% PEG 400溶液	C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）	甲醇：水（75：25）	280
Transtec®（buprenorphine patch）	丁丙诺啡	酰胺类	336.46	0.2% NaN_3的pH 6.0 PBS	C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）	甲醇：0.02 mol/L缓冲液（含20 mmol/L乙酸铵，用冰乙酸调至pH 4.5）（75：25）	280
Evra® Patch	炔雌醇 诺孕曲明	雌激素 孕激素	296.41 327.47	0.2% NaN_3的30% PEG 200溶液	C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）	乙腈：水（55：45）	205

注：[1)] 各 HPLC 色谱条件中柱温均为 40 ℃，流速均为 1.0 ml/min，进样量均为 20 μl

2.3.2 ^3H_2O 经皮渗透试验方法

将裸鼠离体皮肤照“**2.1**”项下方法处理，将其固定于 TK-6A 型体外透皮扩散仪的扩散池上，供给池中加入 ^3H_2O（活度浓度：7 400 Bq/g）3.0 ml，在水浴温度 32 ℃、搅拌速度 200 r/min、透皮面积 2.54 cm^2、接收介质为含 0.2% NaN_3 的 pH 6.0 PBS（体积 6 ml）的条件下试验。定时取样 0.2 ml（同时补充同温等量空白接收介质）于低钾玻璃瓶中，加入 0.8 ml 闪烁液，混合均匀，避光静置 40 min 后，放入液体闪烁计数器中进行测量，每次测量时间为 1 min。记录每个样品的计数率（N）和衰变率（DPM），采用式①和②计算经皮渗透的 ^3H_2O 浓度（c），并计算累积透过量（Q）。

$$c=\frac{N-N_b}{E\times V_0\times 60} \quad 式①$$

$$Q=\frac{c\times V}{S\times 1\,000} \quad 式②$$

式①中，c 为样品的活度浓度 /Bq·L^{-1}；N 为供试品计数率 /min^{-1}；N_b 为本底计数率 /min^{-1}；E 为仪器对该样品的计数效率 /%，通过样品的 DPM 和猝灭校正曲线方程求得；V_0 为样品体积 /ml。式②中，Q 为累积透过量 /Bq·cm^{-2}；S 为透皮面积 /cm^2；V 为接收池体积 /ml。

2.3.3 猝灭校正曲线的建立

精密吸取 ^3H_2O 对照品（活度浓度：37 MBq/g）20 μl 置 100 ml 量瓶中，加入蒸馏水定容，摇匀，作为对照贮备液（活度浓度：7.4 MBq/g），再分别精密吸取 500、100、20 μl 置 100 ml 量瓶中，分别加入蒸馏水定容，摇匀，作为高、中、低活度浓度的标准 ^3H_2O 源（活度浓度分别为：37 000、7 400、1 480 Bq/L）。选用 10 个 7 ml 的低钾玻璃瓶，内置 2 ml 一次性聚乙烯离心管，每个离心管中加入闪烁液 0.8 ml 和中活度浓度标准 ^3H_2O 源 0.2 ml，再分别向瓶中加入不同体积的无氚水作为猝灭剂来配制系列猝灭源；另外向 1 个低钾玻璃瓶中加入闪烁液 0.8 ml 和无氚水 0.2 ml 作为本底。制备好的标准源避光静置 40 min 后放入液体闪烁计数器中进行测量，并记录每个样品的计数率和 DPM，根据式③计算 E。

$$E=\frac{N-N_b}{c_s\times V_s\times 60} \quad 式③$$

式③中，c_s 为加入的标准 ^3H_2O 活度浓度 /Bq·L^{-1}；V_s 为加入的标准 ^3H_2O 源体积 /ml。根据系列标准源的 E 和 DPM 进行线性回归，所得猝灭校正曲线方程为 E=0.055 4DPM+8.844 0（r=0.995 7），表明二者相关性良好，可按此方程计算样品在不同猝灭时间的计数效率。

2.4 皮肤屏障功能评价方法——离体皮肤经皮水分蒸发（TEWL）值的测定

采用 TK-20A 型透皮扩散池，以离体皮肤

TEWL 值的变化评价皮肤屏障功能。

2.4.1 测定前的皮肤预孵

TEWL 值是反映皮肤通透性的一个重要因素，由于离体皮肤缺少像活体皮肤一样的组织状态，需要先对离体皮肤进行透皮预孵，即利用接收介质浸润离体皮肤，从而达到渗透动态平衡，再测定 TEWL 值。

取照“**2.1**”项下方法处理得到的猪离体皮肤固定于供给池与接收池之间，加入接收介质（pH 6.8 PBS），在水浴温度 32 ℃下进行预孵，分别于 0、20 和 40 min 时取出，并用经皮水分流失测量仪测定当前皮肤状态的 TEWL 值。

2.4.2 稳态时间的确定

随着预孵时间的增加，皮肤表面的水分会渐渐蒸发，当接收介质慢慢浸润了皮肤，接收介质和皮肤间会达到渗透动态平衡。测得 0（初始）、20 和 40 min 时猪皮的平均 TEWL 值（n=6）分别为（7.1±2.7）、（8.8±0.9）和（8.9±0.9）$g\cdot m^{-2}\cdot h^{-1}$，RSD 分别为 38.24 %、10.21 % 和 10.54 %。可见 20 与 40 min 时猪皮 TEWL 值的 RSD 均明显小于初始状态，说明 TEWL 值趋于稳定；同时 20 与 40 min 时的 TEWL 值无统计学差异（P>0.05），最终确认 20 min 的时间点作为离体皮肤 TEWL 值达到稳态的时间点。

2.4.3 TEWL 值对药物经皮渗透的影响

取“**2.4.1**”项下不同 TEWL 值的离体猪皮，照“**2.2**”项下方法进行妥洛特罗贴剂（Amiaid®）的体外透猪皮试验，计算经皮渗透量，同时检测初始（0）和稳态（20 min）时的皮肤 TEWL 值。重复试验 9 次，考察 TEWL 值与药物经皮渗透的相关性。结果表明，初始状态和稳态（20 min）时猪皮平均 TEWL 值（n=9）为（8.9±4.0）和（10.0±3.6）$g\cdot m^{-2}\cdot h^{-1}$，RSD 为 45.17%和 35.47%；稳态皮肤（不控制皮肤厚度和质量大小）上 24 h 累积经皮渗透量为（162.34±48.97）μg/cm^2，RSD 为 30.17%（n=9）。采用 SPSS 21 软件进行 Pearson 相关性检验，结果显示药物经皮渗透量与稳态皮肤的 TEWL 值呈现高度正相关性（P<0.000 1），相关系数 r 为 0.967 8；且由于皮肤 TEWL 值的 RSD 较大，在一定程度上造成药物经皮渗透结果 RSD 增大。

2.5 皮肤屏障功能的影响因素及关键质量控制手段

2.5.1 皮肤新鲜度对皮肤屏障功能的影响

2.5.1.1 皮肤贮存时间

采用液体闪烁法测定 ^3H_2O 的经皮渗透量能够较准确地反映皮肤屏障功能的变化，该方法简单、可行。将裸鼠离体皮肤贮存于 －20 ℃环境，分别于 0、1、2、6 和 10 个月时取样，各组连续 7 d 用液体闪烁法测定 ^3H_2O 的经皮渗透量，结果显示贮存 6 个月内皮肤的屏障功能与新鲜皮肤差别不大（见图 1）；但采用贮存 10 个月的皮肤试验时 ^3H_2O 的渗透呈非恒速，d3 开始 ^3H_2O 的累积透过量明显增加，表明皮肤屏障功能受到破坏。

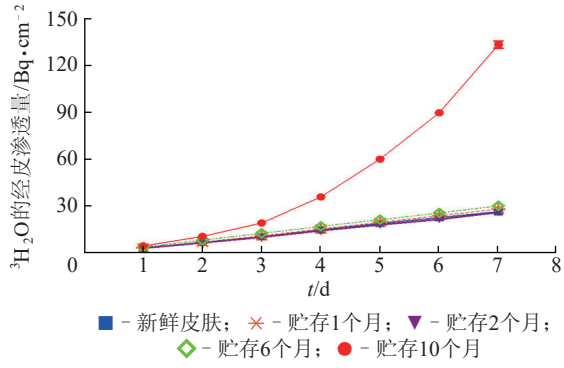


图 1　裸鼠皮肤贮存时间对皮肤屏障功能的影响（n=3）

Fig.1　Effect of Nude Mouse Skin Storage Time on Skin Barrier Function（n=3）

2.5.1.2 案例分析

EVRA® 贴剂是 1 周使用 1 次的避孕透皮贴剂，主要活性成分为炔雌醇和诺孕曲明，能够分别以 20 和 150 μg/d 的速度释药入血并维持 7 d 恒速释药（数据来源：产品说明书）。选择含 0.2% NaN_3 的 30% PEG 200 溶液作为接收介质，分别考察了该贴剂中的炔雌醇在新鲜离体裸鼠皮肤和 －20 ℃条件下贮存 6 个月皮肤中连续 7 d 的体外透皮行为。结果如图 2 所示，在该试验条件下，贴剂中炔雌醇的体外经皮累积透过量呈线性增加，表明皮肤的屏障功能在试验过程中未受影响，药物的透皮速率稳定；同

时比较结果显示新鲜离体皮肤和贮存 6 个月皮肤中药物的透皮速率无显著性差异，表明皮肤贮存 6 个月内屏障性能尚无明显改变。

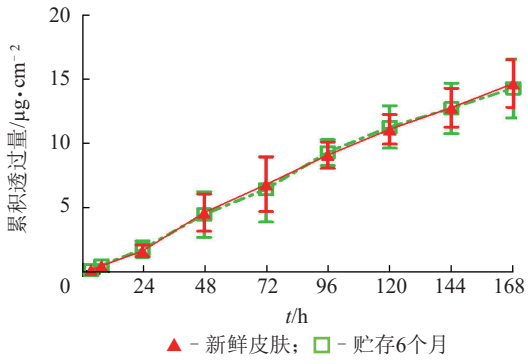


图 2 EVRA® 贴剂中炔雌醇透过新鲜皮肤及贮存 6 个月皮肤的经皮渗透曲线图（n=3）

Fig.2 Transdermal Permeability Curves of Ethinylestradiol from EVRA® Patches through the Fresh Skin and Stored Skin for 6 Months (n=3)

2.5.2 皮肤屏障完整性及差异性的影响

2.5.2.1 通过 TEWL 值监测皮肤质量与厚度的差异

选取 9 块猪离体皮肤（编号为 1# ～ 9#），分别测定 TEWL 值，结果见表 2。可见，编号 1#、2#、7# 的皮肤厚度、质量与其他编号皮肤比较，差异较大；同时，皮肤在初始和稳态（20 min）时 TEWL 值 RSD 均较大，表明皮肤屏障功能有较大差异。

2.5.2.2 案例分析

离体猪皮的皮肤厚度及单位面积的皮肤质量（即皮肤的紧致程度）与猪的个体差异（品种、体质量、产地、生长时间、生长环境等）相关，正常皮肤样本的厚度越大、紧致程度越高，其屏障能力越强，对药物透过量的影响就越大。在仅能大致确认猪的品种、产地、周龄等的条件下，通过游标卡尺测定及称量来控制受试皮肤的厚度及紧致程度，再经过离体皮肤预孵使接收介质和皮肤间达到渗透动态平衡，可减少由于猪的个体差异给透皮试验结果带来的影响。

经统计分析，表 2 中编号 3#、4#、5#、6#、8#、9# 的猪离体皮肤各关键质量因素［即上述确定的皮肤厚度、皮肤质量、稳态（20 min）TEWL 值］的 RSD 均小于 15%，可达到控制皮肤样本间差异的效果。故将上述编号的皮肤入组，照“**2.2**”项下方法进行妥洛特罗贴剂（Amiaid®）的体外透猪皮试验。结果表明，编号 3#、4#、5#、6#、8#、9# 的猪离体皮肤上妥洛特罗的 24 h 累积透过量分别为 156.98、179.97、166.83、158.65、175.78、154.75 μg/cm^2，平均值为（165.49±10.51）μg/cm^2，RSD 为 6.35%。可见，通过控制皮肤关键因素能有效降低透皮结果的误差，使得透过量 RSD<15%。

综上所述，将皮肤厚度和质量的差异控制在 RSD<15%，同时通过 TEWL 值监测结果来选用达

表 2 离体皮肤的厚度、质量差异对 TEWL 值的影响

Tab.2 Effects of Thickness and Mass of the Excised Skins on TEWL Values

编号	厚度/mm	质量/g	TEWL值/g·m^{-2}·h^{-1}	
			初始状态	稳态（20 min）
1#	0.76	0.29	26.1	17.5
2#	0.71	0.25	14.0	16.7
3#	0.95	0.34	6.4	8.0
4#	0.92	0.38	6.7	10.6
5#	1.01	0.36	11.8	9.1
6#	1.00	0.36	6.2	8.9
7#	1.27	0.58	5.1	6.2
8#	0.88	0.35	6.7	9.3
9#	0.90	0.33	6.8	8.3
1#～9#	0.93±0.16（RSD 17.28%）	0.36±0.09（RSD 25.41%）	10.0±6.73（RSD 67.41%）	10.5±3.92（RSD 37.3%）
3#、4#、5#、6#、8#、9#	0.94±0.05（RSD 5.64%）	0.35±0.02（RSD 4.85%）	7.4±2.15（RSD 28.94%）	9.0±0.91（RSD 10.09%）

到稳态的皮肤，可最大程度保证皮肤的均一性，确保体外透皮试验结果的可靠性。

2.6 模型药物的体外经皮渗透性考察

参考“**2.3**”“**2.4**“项下的皮肤质量控制手段和方法，进行模型药物的体外经皮渗透研究，并与原研制剂说明书中的临床释药速率进行比较，进一步说明皮肤质量控制方法的重要性和必要性。

2.6.1 原研制剂中所含药物的基本信息

前期的处方工艺筛选研究，需要对药物（化合物）进行大量的体外经皮渗透试验。本试验中原研制剂中的 8 种模型药物信息见表 1。通过对其体外经皮渗透性的研究，可获得常用动物皮肤模型（裸鼠、猪）经皮渗透吸收速率和临床释药速率的比例关系，帮助指导评价处方设计的合理性。

2.6.2 原研制剂在不同种属皮肤模型上的体外透皮试验

使用 TK-20A 型垂直透皮扩散试验仪考察不同贴剂中药物的体外透皮性能，照“**2.1**”“**2.2**”项下方法进行原研制剂的体外透皮试验。结果见表 3。

由表 3 可见，裸鼠离体皮肤的渗透性显著强于猪皮，说明不同种属皮肤会直接影响皮肤模型的测定结果。

2.6.3 皮肤模型的预测价值

由表 3 可见，非内源性激素药物的离体猪皮渗透系数与临床差距不大，具有一定的预测价值；而内源性激素类药物（如睾酮、雌二醇）的离体猪皮渗透系数与临床释药速率理论值有一定差异[20]。初步推测，其他内源性物质干扰、激素药物体内吸收代谢以及内分泌水平的改变，都可能是引起皮肤中药物吸收变化的因素，因此对于激素药物的经皮吸收，在运用皮肤模型进行预测时需格外谨慎。在无法获得人皮的前提下，前期处方开发筛选时，建议运用多种皮肤模型进行综合评价和预测。对于非内源性激素药物，如炔雌醇、诺孕曲明，其在离体猪皮、裸鼠皮中的渗透系数相对于临床释药速率的差异不大，具有一定的预测价值，但同样也建议运用多种皮肤模型进行综合评价。

3 讨论

皮肤角质层是表皮通透性的主要屏障，对皮肤屏障功能进行评估和研究，可以有效指导人们建立更加科学合理的皮肤模型和方法，是经皮给药系统中研究药物经皮渗透行为的一项基础工作，在生理学、病理学、毒理药理学以及药剂学中均具有重要意义。经皮通透性最恰当的数据应是从人类志愿者的在体试验中获取。但鉴于医学伦理、实验经费等问题，更多时候是采用动物模型替代人体皮肤。最常用的动物包括裸鼠、小鼠、大鼠、家兔、狗、猪、猴等。近年来随着研究工作的深入，人们发现相比之小动物，大动物具有更多的与人类相似的解剖学和生理学特征。

皮肤模型的屏障性能是研究药物经皮渗透的关键要素之一，皮肤屏障功能的研究技术主要分为体外技术和体内技术。本研究建立了液体闪烁法测定氚水的体外经皮渗透，用于评价离体皮肤屏障功能，

表 3 裸鼠和猪的离体皮肤中 8 种药物的渗透系数及其与临床释药速率的比值（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Penetration Coefficients of Eight Drugs through the Excised Nude Mouse Skin and Pig Skin and Their Ratios to Drug Release Rates in Clinical Practice ($\bar{x}\pm s$, n=3)

原研制剂	药物名称	J_{ss}/μg·cm^{-2}·h^{-1}			J_{ss}的比值	
		裸鼠皮	猪皮	临床释药速率[1)]	裸鼠皮∶猪皮	临床∶猪皮∶裸鼠皮
Amiaid®	妥洛特罗	15.58±0.48	5.20±0.47	6.67[20]	3.0∶1	1.28∶1.0∶3.0
Testopatch®	睾酮	1.88±0.07	0.47±0.02	1.67	4.0∶1	3.55∶1.0∶4.0
Oxytrol®	奥昔布宁	17.19±0.68	4.08±0.15	4.17	4.2∶1	1.02∶1.0∶4.2
Sancuso®	格拉司琼	8.64±0.22	2.72±0.08	2.48	3.2∶1	0.91∶1.0∶3.2
Vivelle-Dot®	雌二醇	0.48±0.01	0.12±0.01	0.42	4.0∶1	3.50∶1.0∶4.0
Transtec®	丁丙诺啡	3.78±0.07	1.04±0.08	1.40	3.6∶1	1.35∶1.0∶3.6
EVRA®	炔雌醇	0.09±0.01	0.03±0.01	0.04	3.0∶1	1.33∶1.0∶3.0
	诺孕曲明	0.63±0.05	0.19±0.08	0.31	3.3∶1	1.63∶1.0∶3.3

注：[1)] 除 Amiaid® 以外，其他临床释药速率数据来自各产品说明书

可以有效指导体外透皮试验中的皮肤贮存条件、接收介质等关键试验要素的筛选。TEWL 值是评价皮肤屏障功能的另一个重要指标，TEWL 值越高，则经皮损失的水分越多，说明皮肤角质层屏障功能越差或者皮肤完整性有所缺失，相应的皮肤通透性就会越好，使得药物容易透过[21—22]。因此，TEWL 值与皮肤状态密切相关，影响着药物透皮能力，控制该关键因素可减少皮肤样本给透皮试验带来的差异。

皮肤的新鲜度（皮肤贮存时间）、质量、厚度、TEWL 值等因素可作为皮肤模型的质量控制手段，增加研究结果的可靠性和准确度。本研究为经皮给药系统研究的皮肤模型选择提供了科学依据，表明经过规范有效质控的离体猪皮是理想的皮肤模型。

通过对 8 种模型药物的体外经皮渗透性研究，获得了常用动物皮肤模型（裸鼠、猪）的经皮渗透吸收速率和临床释药速率的关系比例［裸鼠：猪皮：人皮 =（3.0 ～ 4.2）：1.0：（0.9 ～ 1.6），雌二醇、睾酮模型药物除外］，可帮助指导评价处方设计的合理性。将 7 种原研制剂所包含的 8 种化合物的体外经皮渗透系数与产品说明书中临床释药速率理论值进行对比，结果显示，非内源性激素药物的离体猪皮渗透系数与临床差距不大，具有一定的预测价值；而某些内源性激素类药物（如睾酮、雌二醇）的离体猪皮渗透系数与临床吸收有一定差异。

在人体皮肤来源极其有限的前提下，积极探索动物皮肤模型与人体皮肤之间的相关性，用于替代人皮进行有效预测，是经皮给药系统研究领域的一项重要基础工作。

参考文献：

［1］ VAN GELE M, GEUSENS B, BROCHEZ L, *et al*. Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations［J］. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011, **8**(6): 705-720.

［2］ GODIN B, TOUITOU E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models［J］. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, **59**(11): 1152-1161.

［3］ SZYMAŃSKI Ł, JĘDERKA K, CIOS A, *et al*. A simple method for the production of human skin equivalent in 3D, multi-cell culture［J］. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(13): 4644.

［4］ OSHIMA S, SUZUKI C, YAJIMA R, *et al*. The use of an artificial skin model to study transdermal absorption of drugs in inflamed skin［J］. *Biol Pharm Bull*, 2012, **35**(2): 203-209.

［5］ ABD E, YOUSEF S A, PASTORE M N, *et al*. Skin models for the testing of transdermal drug［J］. *Clin Pharmacol*, 2016, **8**: 163-176.

［6］ ROBERTS M E, MUELLER K R. Comparisons of *in vitro* nitroglycerin（TNG）flux across yucatan pig, hairless mouse, and human skins［J］. *Pharm Res*, 1990, **7**(6): 673-676.

［7］ SATO K, SUGIBAYASHI K, MORIMOTO Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil［J］. *J Pharm Sci*, 1991, **80**(2): 104-107.

［8］ SUN Y, FANG L, ZHU M, *et al*. A drug-in-adhesive transdermal patch for S-amlodipine free base: *in vitro* and *in vivo* characterization［J］. *Int J Pharm*, 2009, **382**(1/2): 165-171.

［9］ REN C, FANG L, LING L, *et al*. Design and *in vivo* evaluation of an indapamide transdermal patch［J］. *Int J Pharm*, 2009, **370**(1/2): 129-135.

［10］ ZHAO J H, FU J H, WANG S M, *et al*. A novel transdermal patch incorporating isosorbide dinitrate with bisoprolol: *in vitro* and *in vivo* characterization［J］. *Int J Pharm*, 2007, **337**(1/2): 88-101.

［11］ NICOLI S, PADULA C, AVERSA V, *et al*. Characterization of rabbit ear skin as a skin model for *in vitro* transdermal permeation experiments: histology, lipid composition and permeability［J］. *Skin Pharmacol Physiol*, 2008, **21**(4): 218-226.

［12］ SASAKI H, KOJIMA M, NAKAMURA J, *et al*. Acute toxicity and skin irritation of pyrrolidone derivatives as transdermal penetration enhancer［J］. *Chem Pharm Bull*（Tokyo）, 1990, **38**(8): 2308-2310.

［13］ SIMON G A, MAIBACH H I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview［J］. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2000, **13**(5): 229-234.

［14］ XING Q F, LIN S, CHIEN Y W. Transdermal testosterone delivery in castrated Yucatan minipigs: pharmacokinetics and metabolism［J］. *J Control Release*, 1998, **52**(1/2): 89-98.

［15］ PATEL S R, ZHONG H, SHARMA A, *et al*. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the transdermal iontophoretic delivery of sumatriptan succinate［J］. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, **66**(2): 296-301.

［16］ ZURDO SCHROEDER I, FRANKE P, SCHAEFER U F, *et al*. Delivery of ethinylestradiol from film forming polymeric solutions across human epidermis *in vitro* and *in vivo* in pigs［J］. *J Control Release*, 2007, **118**(2): 196-203.

［17］ BRONAUGH R L, STEWART R F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies V: permeation through damaged skin［J］. *J Pharm Sci*, 1985, **74**(10): 1062-1066.

［18］ BEHL C R, EL-SAYED A A, FLYNN G L. Hydration and percutaneous absorption IV: influence of hydration on *n*-alkanol permeation through rat skin; comparison with hairless and Swiss mice［J］. *J Pharm Sci*, 1983, **72**(1): 79-82.

［19］ 尹伯元. 放射免疫测定基础[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1985: 63-84.

［20］ UEMATSU T, NAKANO M, KOSUGE K, *et al*. The pharmacokinetics of the beta 2-adrenoceptor agonist, tulobuterol, given transdermally and by inhalation［J］. *Eur J Clin Pharmacol*, 1993, **44**(4): 361-364.

［21］ MACHADO M, SALGADO T M, HADGRAFT J, *et al*. The relationship between transepidermal water loss and skin permeability［J］. *Int J Pharm*, 2010, **384**(1/2): 73-77.

［22］ LEVIN J, MAIBACH H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview［J］. *J Control Release*, 2005, **103**(2): 291-299.